



TITLE:

ヌードマウスを用いた非ホルモン性抗癌剤による前立腺癌化学療法に関する研究

AUTHOR(S):

岡田, 謙一郎; 吉田, 修

CITATION:

岡田, 謙一郎 ...[et al]. ヌードマウスを用いた非ホルモン性抗癌剤による前立腺癌化学療法に関する研究. 泌尿器科紀要 1979, 25(10): 993-1007

ISSUE DATE:

1979-10

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/122524>

RIGHT:

ヌードマウスを用いた非ホルモン性抗癌剤による
前立腺癌化学療法に関する研究

京都大学医学部泌尿器科学教室（主任：吉田 修教授）

岡 田 謙 一 郎
吉 田 修EXPERIMENTAL STUDY ON NON-HORMONAL
CHEMOTHERAPY FOR CARCINOMA OF THE
PROSTATE IN NUDE MICE

Kenichiro OKADA and Osamu YOSHIDA

*From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Chairman: Prof. O. Yoshida, M. D.)*

The interest of many urologists in chemotherapy of carcinoma of the prostate has recently arisen in treatment of intractable cases to anti-androgen therapy. Several clinical trials in broadly organized project teams, such as NPCP in U.S.A., are now progressing, but they have not produced definitive conclusions yet. We herein report the experimental results on effectiveness of several non-hormonal anti-tumor agents tested in nude mice with tumors resulting from inoculation of cultured EB 33 cells which had been established from human prostatic cancer tissue. Three representative chemotherapeutics such as 5-fluorouracil (5-FU) or Futraful, a masked compound of 5-FU, cyclophosphamide (CPM) and vincristine (VCR) were principal candidates for the experiment, and cis-diamminedichloride platinum (CDDP) and Estracyt were also tested. The effect of these drugs was evaluated through statistical analysis of the tumor growth curve compared to that of the control group. The drugs were usually injected intraperitoneally for consecutive 14 days except for VCR, 7 times per 3 days, and CDDP, for consecutive 5 days. The results obtained are as follows.

1) 5-FU, 20 mg/kg, did not show tumor reduction, while 60 mg/kg of FT did a tendency of growth inhibition compared to controls with less decrease of body weight than 5-FU.

2) CPM and VCR brought a significant tumor reduction compared to controls at the doses of 10 mg and 0.45 mg per kg, respectively. In VCR group, however, 3 of 6 animals suffered from distension of intestine during experimental period, while only minimal loss of body weight occurred in CPM group.

3) A combination of 2 of 3, and all of the 3 above mentioned agents were also examined if there was a synergic effect among them. CPM plus VCR showed an additive effect, but neither multiplied nor additive effect was recognized in other combinations.

4) Estracyt, 20 mg/kg, did not show any significant change in tumor growth, although rather marked decrease of body weight occurred at this dose.

5) CDDP showed apparent inhibition of tumor growth, although shortage of numbers of tested animals prevented from statistical analysis.

It is concluded through the experimental result that CPM and/or VCR, and CDDP seem to be effective chemotherapeutics for carcinoma of the prostate. The result has almost corresponded to

those in clinical reports up to date. This experimental model will be a useful tool in further study for carcinoma of the prostate, since EB 33 cells well preserve original characteristics as human prostatic epithelial cells.

はじめに

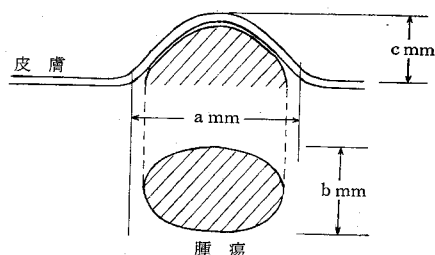
前立腺癌治療の現況は、依然除根術および合成エストロジェン剤投与による抗男性ホルモン療法（以下単にホルモン療法と呼ぶ）が大勢を占めているが、エストロジェン製剤による心血管系への副作用¹⁾とともに、ホルモン療法に対して初めから抵抗性を示したり経過中に再燃する症例に遭遇し、次第にこの治療の限界が明らかとなり、近年前立腺癌に対する放射線療法、あるいは非ホルモン性抗腫瘍剤による化学療法（以下単に化学療法と呼ぶ）に大きな関心が寄せられている。ことに、進行した再燃例に対しては現状では化学療法に頼らざるをえない状態であり、有効な化学療法確立の必要性が認識され、最近その機運はにわかに高まっている。しかしながら、前立腺癌組織の抗腫瘍剤に対する感受性は一般に低く、対象が高齢者でしかもしれば骨転移を有しているため薬剤に対する耐性が低いことなど²⁾化学療法を困難なものとする障害も少なくない。適切な試験によって有効性の証明された薬剤は少なくとも1975年までは皆無であり³⁾、最近ようやく2, 3の薬剤について試験結果が明らかにされつつあるが、さらに今後の基礎的および臨床的研究が待たれているのである。しかるにヒト前立腺癌の *in vitro* 細胞培養、あるいは移植実験は従来きわめて困難とされ、また動物実験モデルにしても、本来ヒト前立腺組織とは *heterologous* というばかりでなく、組織発生の学的にも相違する点があり、ごく限定された目的にしかな用いられなかった。このような状況の下でわれわれはかねてよりヒト前立腺癌の細胞培養およびヌードマウスの異種移植を試み、種々な目的で基礎実験モデルの確立に努めてきた⁴⁻⁶⁾。今回われわれは、ヌードマウスにヒト前立腺癌由来培養細胞 EB 33⁷⁾を接種し、生じた腫瘍の増殖曲線の比較によって、作用機序を異にする代表的な薬剤について単剤効果、および併用効果を検討し、さらに最近臨床的に効果の注目されている Estracyt および *cis*-diamminedichloride platinum (CDDP) についても実験を行なったのでこれらの結果について報告する。

実験材料と方法

生後およそ6週齢の雌雄ヌードマウスの背部皮下に、予め継代培養中の EB 33 細胞を 0.25%トリプシン処

理後、培養液にておよそ 10^7 /ml の細胞浮遊液とし 0.1 ml ずつ注射した。EB 33 細胞は、全実験を通じて第 63~68 代継代のものを用い、培養条件は基本的には既報の方法^{4,6)}によるが、その後の検討で *in vitro* 増殖曲線および細胞の形態にほとんど差のないことが確かめられたので、Ham's F-10 の代りに MEM 培養液 (Flow Laboratories, USA) を用い、10%の濃度で胎児牛血清を添加した。培養液中に $1.0 \mu\text{g/ml}$ の割合で常にテストステロンを加えたことには変りない。なお実験に用いた 63~68 代 EB 33 細胞の *in vitro* の継代増殖曲線はほぼ一定であった。

実験に用いたヌードマウスは、この細胞集団になおわずかながらアンドロジェン依存クローンの存在することを考慮し⁸⁾、すべて実験開始48時間以前に去勢した後、直ちにテストステロン・プロピオネートを $1.0 \mu\text{g/g/day}$ の割合で投与を開始し、実験中ホルモン環境を一定に保つよう努めた。細胞接種後 4~6 日目より形成される腫瘍（以下 EB 33 腫瘍と呼ぶ）の計測を始め、2 日ごとに施行してその体積を Fig. 1 に示す方式に従って求め、半対数グラフ上に plateau に達するか実験の終了するまで継続する。



$$V = \frac{\pi}{6} (a-0.4) (b-0.4) (c-0.2)$$

(ヌードマウスの皮膚平均 0.2 mm を、それぞれの計測値より差し引いて補正した)

Fig. 1. 腫瘍の計測法と体積を求める近似式

腫瘍の増殖が半対数グラフ上で直線相に入ったことを確かめた後、6~10日目に原則として各群5匹として（対照群のみ20匹）各薬剤の投与を開始し、これを第1日として、各群の腫瘍の大きさの平均値を移植後の日数が等しい対照群の腫瘍増殖曲線と比較して薬剤の効果を検討した。また副作用の程度を知るためおよび薬剤間の濃度バランスを検討するため、腫瘍の計測

と同時にすべてのマウスの体重を測定して各群で投与前に比べて平均増減量を求めた。

実験を行なった化学療法剤は Table 1 に示すとうりで代謝拮抗剤として 5-fluorouracil (5-FU) およびその masked compound である FT-207 (Futrafal, 以下 FT と略す), アルキル化剤として cyclophosphamide (以下 CPM と略す), また分裂阻害剤として vincristine (以下 VCR と略す) を選択して, これら薬剤の単剤としての効果, および併用による相加ないし相乗効果につき検討した。ただし併用効果検討時における代謝拮抗剤としては, 後述の理由により FT を選んだ (Table 1)。またこれらの標準化学療法剤以外に, 最近前立腺癌の治療剤として注目を浴びている Estracyt および CDDP についても効果を検討した。前者は Fig. 2 に示すとうり, estradiol-17 β -diphosphate の C₃ 水酸基に nitrogen mustard が結合した合剤であり, また後者は Fig. 3 のようにプラチナ原子を中心にアンモニアおよび塩素が平面に対しシス位に對した錯体である。

各薬剤の投与量の決定にあたっては, 臨床常用量の 3 倍を一応の基準としたが, 予備実験における副作用

Table 1. 化学療法剤と実験群

実験群	薬 剤 名	投 与 量 (mg/kg/day)	ス ー ド マウス数
1	対照群		20
2	5-FU	20 mg	4
3	FT-207 (FT)	60 mg 100 mg	13 5
4	Cyclophosphamide (CPM)	10 mg	6
5	Vincristine (VCR)	0.45 mg	6
6	FT CPM	50 mg 5 mg	5
7	FT VCR	50 mg 0.225 mg	4
8	CPM VCR	5 mg 0.225 mg	4
9	FT CPM VCR	30 mg 3.3 mg 0.15 mg	6
10	Estracyt	20 mg	6
11	CDDP	1.5 mg 3 mg	2 2

1) 5FU, FT-207, CPM Estracyt は連日14日間, CDDPは連続5日間投与。

2) VCRは3日ごとに7回投与

3) 投与方法はいずれも腹腔内(IP)に0.1ml/20g体重の割合に蒸留水で希釈して投与し, 対照群には体重該当量の蒸留水のみ注射した。

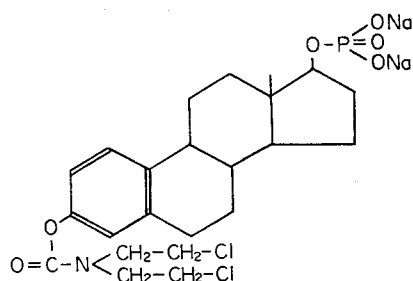


Fig. 2. Estracyt の化学構造式。

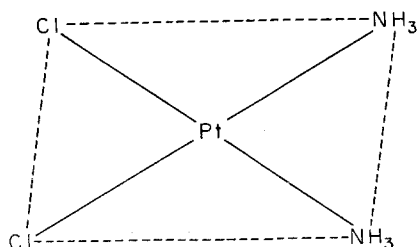


Fig. 3. Cis-diamminedichloride platinum (CDDP) の構造式。

の軽重により多少増減した。Table 1 に示すとうり, 単剤としての効果検討には 5-FU 20 mg/kg, FT 60 mg および 100 mg/kg, CPM 10 mg/kg, VCR 0.45 mg/kg を用い, これらのうち 2 剤および 3 剤併用ではそれぞれ上記濃度 (FT は 100 mg/kg とした) の 1/2 および 1/3 を用いて併用による効果を検討した。また Estracyt は 20 mg/kg, CDDP は 1.5 mg および 3 mg/kg の 2 濃度を用いた。

これらの薬剤はすべて 1 日あたりのもので, 5-FU, FT, CPM および Estracyt は連続 14 日間, CDDP は 5 日間連続投与したが, VCR のみ 3 日に 1 回通算 7 回投与した。投与方法はいずれも腹腔内 (IP) 注射で, すべての薬剤は 0.1 ml/20 g 体重の割合で蒸留水に溶解したものを用いた。なお対照群には体重該当量の蒸留水のみを IP 投与した。

結 果

1. 対照群の腫瘍増殖曲線

対照群 20 匹の EB 33 腫瘍の体積の経時的変化は Table 2 に示すとうりで, 5 日目より増殖期に入り 40 日目まで着実に増殖する。これを半対数グラフ上に図示すると, Fig. 4 のごとく第 5 日より 40 日目まで相関係数のきわめて高い直線が得られる ($r=0.9871$)。したがって, 10^6 個の細胞接種後得られる EB 33 腫瘍について, 5~7 日目からおよそ 40 日目までの期間で, 各化学療法剤の効果判定がこの対照群腫瘍増殖曲線

Table 2. 対照群20匹の経時的腫瘍体積および平均体重の変動

移植後 日数	体 積 (cm ³) (平均値±SE)	体 重 * 増 減 (gm)
5	0.023±0.0024	—
7	0.026±0.0036	0.2
9	0.029±0.0036	0.2
11	0.039±0.0029	0.2
13	0.044±0.0113	-0.1
15	0.060±0.0105	-0.7
17	0.070±0.0156	0.5
19	0.090±0.0267	-0.6
21	0.092±0.0266	0.3
23	0.106±0.0270	0.1
25	0.099±0.0427	-1.2
27	0.139±0.0437	-0.7
29	0.180±0.0904	-0.6
33	0.195±0.0694	-1.0
36	0.218±0.0675	0
40	0.308±0.0920	0.2

* 移植後5日目を基準とした。

Control growth curve

(n = 20)

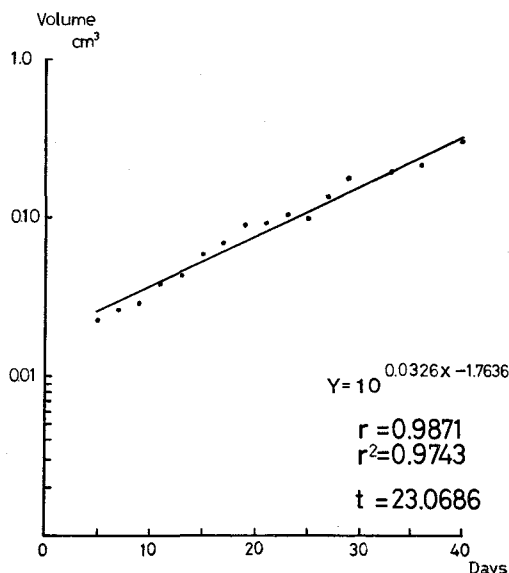


Fig. 4. 対照群ヌードマウス20匹のEB 33腫瘍の増殖曲線。

(以下単に対照群と略す)と比較し有意差検定を行なうことによって可能であり、以下この方法によって薬剤の効果を検討した。

2. 5-fluorouracil (5-FU)

4匹のヌードマウスに細胞接種後5日目より5-FU 20 mg/kg/dayを連日14日間IP投与を行なった。投与開始日を第1日として投与群の腫瘍体積(平均値±SE)の変動を対照群とともに図示するとFig. 5のごとくで、1週目までは縮小する傾向にあるが対照群との間に有意差はなく、その後漸次増大し始め、群内比較でも第15日目から投与開始時にくらべて有意に増大しつづける($p < 0.05$)。一方投与群の平均体重減少は中等度にみられ、第13日目に-3.1 gと最も顕著でありこの濃度がほぼ耐容量上限と思われた。また薬剤の性格上濃度依存性は低いことが知られているので投与量は増量しなかったが、EB 33腫瘍に対する5-FUの有効性は低いといえる(Fig. 5)。

3. FT-207 (FT)

5-FUのmasked compoundであるFTを、まず3匹のヌードマウスに対し30 mg/kg/day 1週間投与して予備実験を行なったがEB 33腫瘍の増殖は抑制されなかった。他方副作用もほとんどみられなかったので60 mg/kg/dayに増量し、細胞接種後7日目より13

5-Fluorouracil

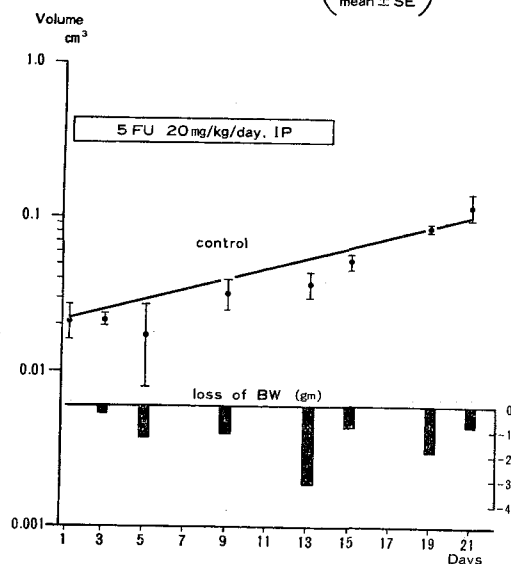
(n = 4
mean ± SE)

Fig. 5. 5-FU 20 mg/kg/day 連日14日間投与による4匹のヌードマウスEB 33腫瘍の体積の変動(平均値±SE)および平均体重の減少。

匹のヌードマウスに対し連日14日間投与した。結果はTable 3 およびFig. 6 に示すとうり対照群にくら

Table 3. EB 33 腫瘍担癌ヌードマウス(13匹)に対するFT-207 60mg/kg 連日14日間投与の効果

移植後 日数	注射開 始から の日数	体 積 (cm ³) (平均値±SE)	平均体 重増減 (g)	検 定 対照群 初期値
7	1	0.026±0.0044	—	NS —
9	3	0.022±0.0052	-0.1	NS NS
11	5	0.031±0.0078	0	NS NS
13	7	0.035±0.0058	0	NS *(+)
15	9	0.034±0.0071	+0.1	*(-) NS
17	11	0.052±0.0098	0	NS **(+)
19	13	0.082±0.0245	-0.1	NS **(+)
21	15	0.100±0.0285	0	NS **(+)
23	17	0.127±0.0376	+0.1	NS **(+)
25	19	0.225±0.0838	+0.2	NS *(+)
27	21	0.202±0.0744	+0.3	NS *(+)

太字は投与
の行なわれ
た期間を表
わす。

* P<0.10
** P<0.05
(+)は増大、(-)
は縮小を示す。

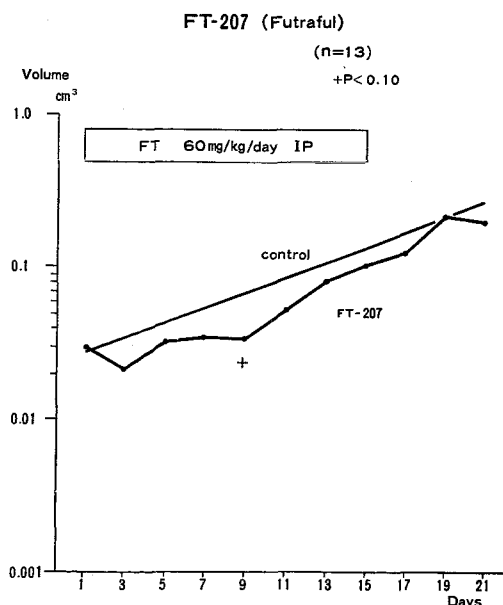


Fig. 6. FT 60mg/kg/day 連日14日間投与による13匹のヌードマウス EB 33 腫瘍の増殖曲線。第9日目に対照群にくらべ縮小の傾向がみられる (P<0.10)。

べ増殖は一般にゆるやかで、注射開始9日目には縮小の傾向 (p<0.10) がみられた。

一方投与群の体重はほとんど変動しなかったので、念のため 100 mg/kg に増量して5匹のヌードマウスについて同様の実験を行なったところ、60 mg/kg の場合とはほぼ同様に軽度の増殖抑制がみられたが対照群にくらべ有意の縮小ではなかった。また体重減少は100 mg/kg では軽度ないし中等度にみられ、以上の結果から FT は EB 33 腫瘍に対しかなり抗腫瘍効果をもつものと判定した。

4. cyclophosphamide (CPM)

6匹のヌードマウスに移植後7日目より CPM 10 mg/kg を連日14日間投与したところ、Table 4 および Fig. 7 に示すとうり、注射後9日以降21日まで対照群にくらべて、かつ7日目以降は初期値にくらべいずれも有意の縮小を示した。また平均体重の減少は投与前のそれにくらべ0.5 g 以内と軽度であり、EB 33 腫瘍に対して優れた抗腫瘍効果をもつことが判った。

5. vincristine (VCR)

6匹の担癌ヌードマウスに EB 33 細胞接種後9日目より VCR 0.45 mg/kg/day を3日ごとに7回投与したところ、Table 5 および Fig. 8 に示すとうり、3日目、7日目にそれぞれ対照群にくらべ有意の縮小

Table 4. EB 33 腫瘍担癌ヌードマウス(6匹)に対するcyclophosphamide (CPM) 10 mg/kg 連日14日間投与の効果

移植後 日数	注射開 始から の日数	体 積 (cm ³) (平均値±SE)	平均体 重増減 (g)	検 定 対照群 初期値
7	1	0.033±0.0067	—	NS —
9	3	0.028±0.0071	-0.5	NS NS
11	5	0.027±0.0096	0	NS NS
13	7	0.023±0.0079	-0.1	NS *(-)
15	9	0.017±0.0088	-0.3	**(-) *(-)
17	11	0.014±0.0080	-0.1	**(-) **(-)
19	13	0.016±0.0078	-0.5	*(-) **(-)
21	15	0.017±0.0085	+0.2	*(-) **(-)
23	17	0.015±0.0068	-0.3	**(-) **(-)
25	19	0.020±0.0085	0	*(-) *(-)
27	21	0.022±0.0102	-0.1	*(-) NS

太字は投与
の行なわれ
た期間を表
わす。

* P<0.10
** P<0.05
(-)は縮小を示す。

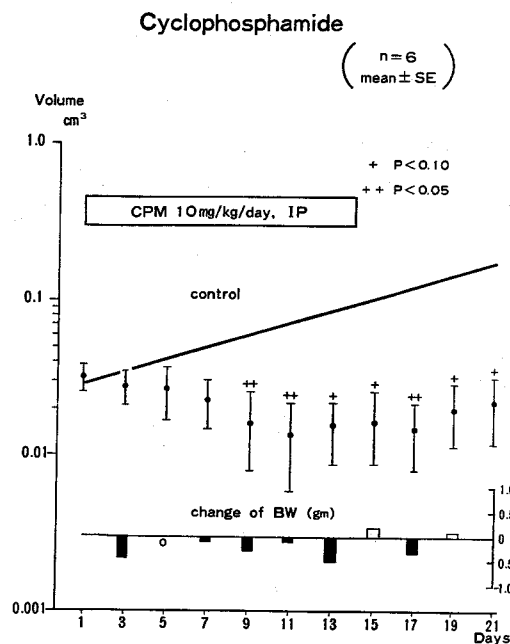


Fig. 7. CPM 10 mg/kg/day 14日間連続投与による6匹のヌードマウス EB 33 腫瘍の体積の変動 (平均値±SE) および平均体重の増減。

Table 5. EB 33 腫瘍担癌ヌードマウス (6匹) に対する Vincristine (VCR) 0.45 mg/kg 3日 毎7回投与の効果

移植後 日数	注射開 始からの 日数	体 積 (cm ³) (平均値±SE)	平均体 重増減 (g)	検 定	
				対照群	初期値
9	1◎	0.033±0.0073	—	NS	—
11	3	0.025±0.0061	-0.3	**(-)	**(-)
13	5	0.028±0.0111	-1.0	NS	**(-)
15	7◎	0.013±0.0040	-0.7	**(-)	**(-)
17	9	0.014±0.0062	-0.5	*(-)	NS
19	11◎	0.017±0.0059	-0.8	*(-)	NS
21	13◎	0.024±0.015	-0.6	不 能	不 能
23	15◎	0.029±0.017	+0.4	"	"
25	17	0.027±0.011	+0.8	"	"
27	19◎	0.011±0.006	-1.8	"	"
29	21	0.017±0.009	-1.4	"	"

◎印はVCR
の投与された
日を示す。

* P < 0.10
** P < 0.05
(-)は縮小を示す。

がみられた ($p < 0.05$)。また群内比較でも3, 5, 7および11日目にそれぞれ初期値に対して有意に縮小した ($p < 0.05$)。ただし平均体重減少は2g以下であったが、

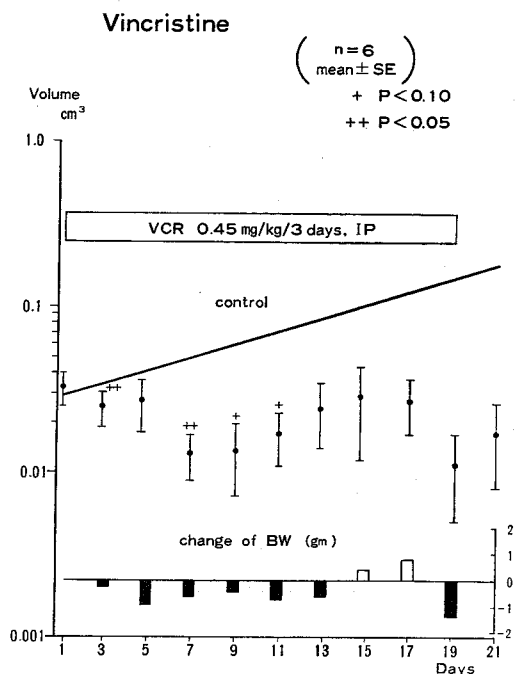


Fig. 8. VCR 0.45 mg/kg/day 3日 毎7回投与による6匹のヌードマウス EB 33 腫瘍の体積の変動 (平均値±SE) および平均体重の増減。

半数 (3匹) が13日目以降腸管が高度に膨満し、イレウス様の所見を呈したため屠殺し、それ以後の検定は不能であった。このイレウス症状は、VCR の副作用のひとつである末梢神経障害によると考えられ、EB 33 腫瘍に対する抗腫瘍効果は認められたがこの濃度では副作用もかなり強いことが推察された。

6. 2剤併用

FT, CPM および VCR の3剤のうちそれぞれ2者を選んで併用した場合の効果を検討した。組み合わせは Table 1 に示したごとく1群5匹として、FT + CPM, FT + VCR, CPM + VCR の3通りで、投与方法および投与回数は単剤効果を検討した実験と同様であるが、投与量はそれぞれ1/2に減量した。すなわち1回あたり FT 50 mg/kg, CPM 5 mg/kg, VCR 0.225 mg/kg の注射を前2者は連続14日間、VCR は3日に1回通算7回、全体として0.1 ml/20g マウス体重ずつIP投与した。結果は Fig. 9, 10, 11 に示すとうり、それぞれ移植後対応する日時の対照群と比較し検定可能な限りで有意の縮小傾向がみられたのは CPM + VCR 併用群のみであった。その他 FT + CPM 群では対照群にくらべ全般的に増殖は抑制されるようであったが有意と認められないかまたは検定不能であった。

Futraful and Cyclophosphamide

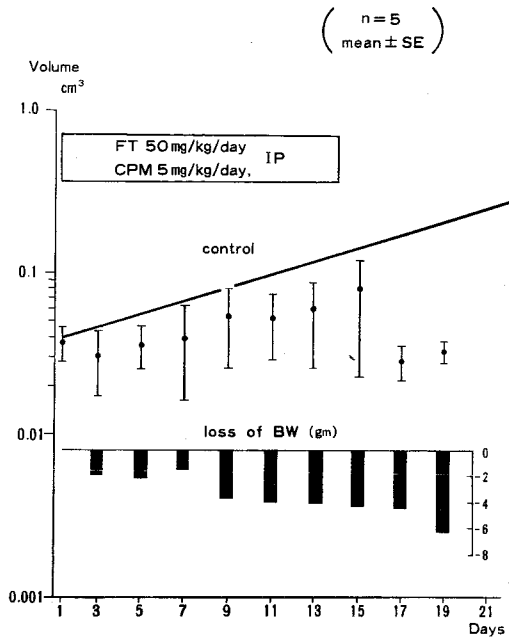


Fig. 9. FT-207 50 mg/kg, CPA 5 mg/kg 併用によるヌードマウス5匹の EB 33 腫瘍の体積の変動 (平均値 \pm SE) および平均体重減少.

Cyclophosphamide and Vincristine

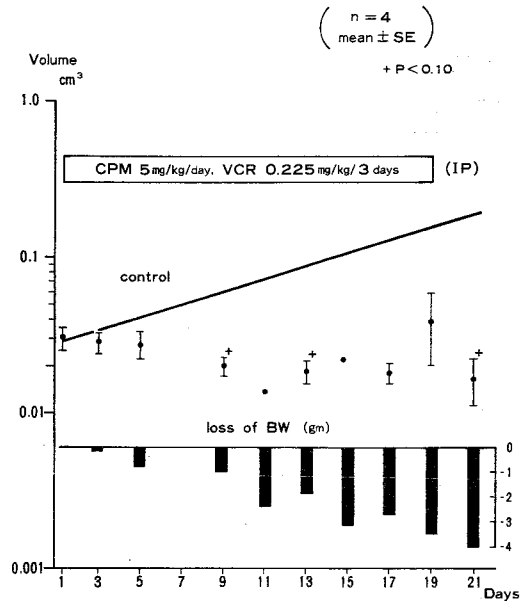


Fig. 11. CPM 5 mg/kg, VCR 0.225 mg/kg 連日 14 日間投与による4匹のヌードマウス EB 33 腫瘍平均体積の変動 (平均値 \pm SE) および平均体重減少.

Futraful and Vincristine

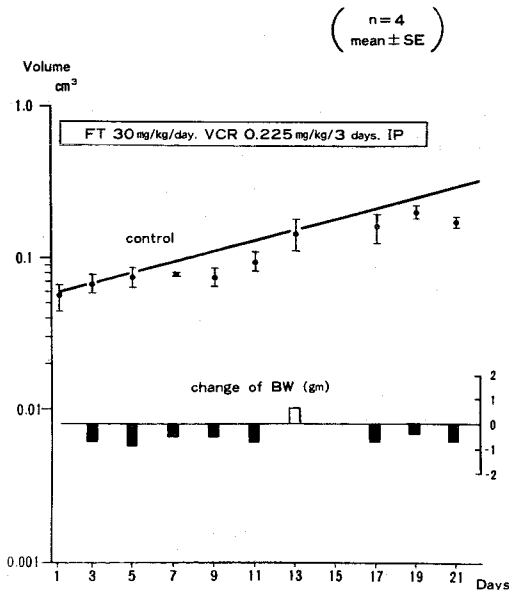


Fig. 10. FT 30 mg/kg 連日14日間, VCR 0.225 mg/kg 3日毎7回投与によるヌードマウス4匹の EB 33 腫瘍の体積の変動 (平均値 \pm SE) および平均体重の増減.

一方体重減少からみた副作用の検討では、FT + VCR 群は実験期間中平均 1 g 以下と軽度であったが、FT + CPM および CPM + VCR 群では最高 4~6 g におよび、副作用も同時に加算されることが推察された。

7. 3剤併用

前項の実験で CPM + VCR に相加効果が認められ、FT + CPM にその傾向が示唆されたので、これら3剤の併用効果を検討した。投与方法、投与回数は単剤効果の検討と同様であるが、各薬剤の濃度はそれぞれ 1/3 に減量した。すなわち FT 30 mg/kg, CPM 3.3 mg/kg, VCR 0.15 mg/kg で、前2者は連14日日間、VCR は3日ごとに7回、全体として 0.1 ml/20 g マウス体重ずつ投与した。結果は Fig. 12 に示すとうり、6匹のヌードマウスによる実験では移植後対応する日時の対照群よりも増殖抑制の傾向をみたが有意と判定されなかった。

8. Estracyt

6匹のヌードマウスに、EB 33 細胞接種後7日目より Estracyt 20 mg/kg を連日 14 日間投与したが、Fig. 13 にみるとうり増殖抑制は軽度であり、対照群との間に有意の差はなかった。また体重減少は中等度であり、投与終了時に平均 -1.8 g 減少した。

Futrafal, Cyclophosphamide and Vincristine

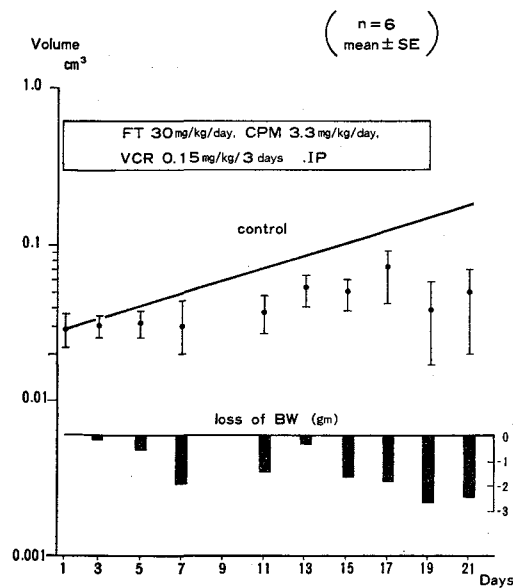


Fig. 12. FT 30 mg/kg, CPM 3.3 mg/kg 連日 14 日間, VCR 0.15 mg/kg 3 日毎 7 回投与. 3 剤併用による 6 匹のヌードマウス EB 33 腫瘍の体積の変動 (平均値 \pm SE) および平均体重減少.

Estracyt

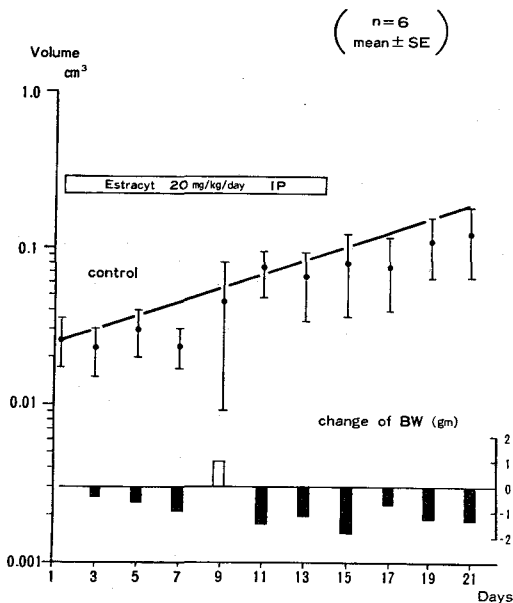


Fig. 13. Estracyt 20 mg/kg 連日 14 日間投与による 6 匹のヌードマウス EB 33 腫瘍の体積の変動 (平均値 \pm SE) および平均体重減少.

Effect of CDDP to EB 33 tumor

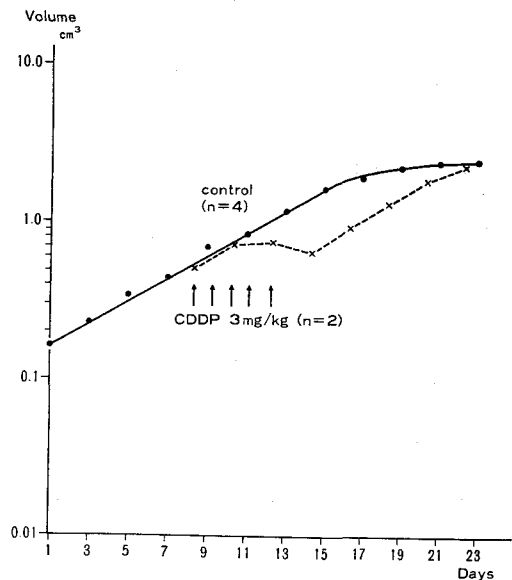


Fig. 14. CDDP 3 mg/kg/day 5 日間連続投与によるヌードマウス 2 匹および対照群 4 匹の腫瘍増殖曲線.

9. cis-diamminedichloride platinum (CDDP)

上記の一連の実験と別に、第 84 代 EB 33 細胞を用いて CDDP の効果につき予備的実験を行なった。ヌードマウスのホルモン環境等は一定であったが、実験準備期間を短縮する目的で接種する細胞数はおよそ 10^3 /ml 培養液の細胞浮遊液とし、その 0.1 ml を背部皮下に接種した。また効果の相違をより明確にするため初期体積 (薬剤投与開始時の腫瘍体積) を大きくした。細胞接種後 5 日目から、対照群を 4 匹とし、2 匹ずつのヌードマウスに CDDP を 1 日 1.5 mg/kg, 3 mg/kg の 2 濃度で 5 日間連続投与し、後者の増殖曲線を対照群のそれとともに図示した (Fig. 14)。少数例の実験ではあるが、CDDP 1.5 mg/kg 投与では対照群とほとんど差はないが、3 mg/kg 投与で、図に示すとうり短期間ではあるが明らかな腫瘍の縮小ないし増殖抑制が伺われた。

考 察

前立腺癌に対する非ホルモン性化学療法はすでに 1950 年代後半から、進行したホルモン療法再燃例に対してさまざまな形で試みられてきた。

1959 年 Weyrauch ら⁷⁾ の Thio-TEPA による治療をはじめ、cyclophosphamide⁸⁾ (Fox, 1965), nitrogen-mustard⁹⁾ (Flocks, 1969) など一連のアルキル化剤に

関する報告がつづき、これらはいずれも限定された少数例にはあるが疼痛の軽減、自覚症状の改善など、一時的な他覚的改善をえている。また、1968年 Flocks and Chang¹⁰⁾ (1968) は nitrogen mustard と 5-FU の併用によって 12 例中 6 例に Karnofsky 分類による I-A 以上の寛解が得られたといい、その他 Tucker et al.¹¹⁾ (1968), 最近では Kane et al.¹²⁾ (1977) らの主として乳癌に対する regimen を応用した多発併用療法が試みられてきた。その他に BCNU, methyl CCNU などの nitrosourea 系薬剤, vincristine あるいは vinblastine などの vinca alkaloid, methotrexate, FUDR などの代謝拮抗剤, また mithramycin, mitomycin C, adriamycin などの抗腫瘍抗生剤と多剤にわたって試みられてきたが^{3,13)}, いずれも少数例に対する限られた試験であり、少なくとも 1975 年までは適切な評価によって有効と判定されたものはない状態であった³⁾。このような従来の抗腫瘍剤による治療とは別に、1960 年代後半から主として北欧を中心に前述の Estracyt の有効性、ことにホルモン療法再燃・抵抗例に対する効果が期待されて広く臨床試験が行われてきた。Andersson¹⁴⁾ (1975) の集計によると、466 例の患者のうち 276 例 (59%) に positive response が得られたといい、そのうちすでにエストロゲン療法を施行されていた症例では 402 例中 223 例 (55%), 未治療いわゆる新鮮例では 64 例中 53 例 (83%) に有効であったという。本邦においても 1977 年来 Estracyt の臨床試験がほぼ全国的な規模で施行されその成果も集約されつつあるが、ホルモン療法再燃例に対する効果など詳細はいまだ明らかでない。

前立腺癌化学療法にかんするこれまでの臨床研究はこのような例外を除いておおむね個々の医療機関における小規模なトライアルに終始し、その重要性が認識されていたにもかかわらず泌尿器科領域では比較的等閑視されていたこともまた事実であって、例えば Carter and Soper¹⁵⁾ によると、利用可能なすべての抗腫瘍剤のうち前立腺癌治療に使用されたものは 10% にすぎず、一方睾丸腫瘍に対しては 34% が、結腸癌、肺癌に対しては 90% の薬剤が試験されたという。

前述のとうり、前立腺癌の化学療法を困難にする因子も少なくないことは事実であるが、このように一方では泌尿器科医の関心が低かったことも否定できず、理由のひとつとしてホルモン療法が圧倒的な頻度で施行されており、かつ劇的に奏効する症例も少なからず経験することが積極的に化学療法に取り組む姿勢を鈍麻させていたことを Schmidt¹⁶⁾ も指摘している。

ホルモン療法の限界とこれを代償する化学療法の重

要性が次第に認識されるようになり、とくに症例割り付けのランダム化、効果判定規準の均一化の下で、多数例における正当な試験が求められるようになったが、欧米においてこのような試験を目的の一つとして幾つかの系統的なリサーチ・グループが組織されるようになった。そのひとつは、1973 年米国における National Prostatic Cancer Project (NPCP) であり、前立腺癌に対する基礎的研究とともに、有効な化学療法の確立を目指して広く臨床試験が行なわれ、現在もお進中である。1975 年ごろより順次その成果が報告されつつあるが、ホルモン療法再燃例に対して 5-FU および cyclophosphamide が、非ホルモン性化学療法剤以外の従来の諸治療にくらべ部分的寛解が有意に高率であり、生存期間も延長すること¹⁷⁾, また両剤の比較では CPM の方が 5-FU にくらべて延命効果でより有効であること¹⁸⁾, などが明らかにされた。また adriamycin (以下 ADM と略す) についてもその有効性が報告され¹⁹⁾, とくに Mayo Clinic 一派からは、投与量の相違はあるものの前記両剤よりも優れた効果がランダム割り付け試験によって報告されており²⁰⁾, 現在 NPCP プロトコールではこの 3 剤が単剤として有効であると認めている²¹⁾。最近 Chlebowski et al.²²⁾ (1978) は、ランダム試験により CPM 単独投与と、これに ADM, 5-FU を加えた 3 者併用療法の治療成績を比較し、両群でほぼ半数に病状が固定したこと、治療に反応するもののみの比較では、CPM 単独の方に生存期間が有意に延長していたと報告している。さらに 1976 年末ごろから、広い雨域で CDDP の抗癌性を証明する報告が相次いでいるが、前立腺癌に対しても Merrin²³⁾ (1977) により最初の試験結果が報告され、1 例の新鮮例を除いた先行治療無効な 21 例に対して 43% の他覚的寛解を得、現今の化学療法剤の中では最も有効なものであろうと述べている。

以上前立腺癌化学療法の歴史と現況について概略を述べたが、混迷の時期からようやく 1975 年を境として、統一されたプロトコール、症例のランダム割り付けなどによる正当に評価された試験成果が次第に集積されつつある。しかしながら、現在までに得られた知見はいまだ限られたものであり、より有効な化学療法確立を目指してなお一層の努力が払われているのである。

このような状況の下で、われわれはこの度現在保有している *in vitro* および *in vivo* 実験系を組み合わせ前立腺癌に対する化学療法剤の効果を検討したのである。すなわち、前立腺癌由来の永久細胞株 EB 33 をヌードマウスに移植し、生じた腫瘍の増殖曲線を対照群のそれと比較することにより投与した薬剤の増殖抑

制効果を検討した。

およそ化学療法を行なうにあたって最も望ましいのは、予じめ実験的に有効な薬剤が何であるかを知り、これらを組み合わせることである。抗腫瘍剤の多くは正常な生体組織、ことに造血臓器をはじめ主要臓器への障害、免疫能の低下などをもたらす有効性の低い薬剤の使用は患者の生体予備能を損なうばかりでなく、癌そのものの発育を促進さへするからある²⁴⁾。

現在施行されている代表的な抗腫瘍剤の感受性試験は、大別すれば組織培養、細胞培養を利用する *in vitro* 実験系であり、また *in vivo* 実験系である。後者はマウス、ラットにおける実験腫瘍を移植した担癌動物を用いる方法が現在も主流をなしているが、1973年ごろからヒト癌組織を直接にヌードマウスに移植し、これを用いて抗腫瘍効果を検討する方法が次第に普及しつつある。

これら両実験系にはそれぞれ長短があり、*in vitro* 細胞培養では短時間で比較的簡単な操作により均質な結果を得やすいという利点はあるものの、細胞の薬剤に対する感受性をスクリーニングすることはある程度可能であっても、生理的な条件と異質の環境で固型腫瘍でなく遊離細胞を対象とするため、得られた結果を生体へフィードバックした際に不一致を生じることも少なくない。さらに、生体内で代謝されて作用を発揮する薬剤、例えば masked compound について *in vitro* での検討は本質的に不可能である。このような観点から、われわれは EB 33 細胞を用い直接に *in vitro* 実験を行なうことを避けたのである。

一方、前立腺癌組織をヌードマウスに移植して行なう *in vivo* 実験では、患者そのものの、ないしは同一組織を対象にする点では理想的といえるが、前立腺全切除術の症例が非常に少なく移植に供すべき新鮮な組織そのものを得がたいこと、さまざまな努力にもかかわらずヌードマウスにおける成着率はおよそ70%であり、しかも発育はきわめて緩徐である²⁵⁾ ため薬剤の効果判定のパラメーターに乏しいという難点がある。少なくとも現在前立腺癌においては、癌組織を用いて、まして個々の症例についてそれぞれ *in vivo* 実験を行なうことは不可能である。よってわれわれは、*in vitro* および *in vivo* 実験系を組み合わせ、EB 33 細胞をヌードマウスに接種し、生じた腫瘍 (EB 33 腫瘍) を対象として作用機序を異にする代表的な化学療法剤について経時的な腫瘍増殖曲線、とくに移植後の日時が対応する対照群のそれと比較することによってこれら薬剤の効果を検討することにした。

実験に用いた EB 33 細胞については、現在までに

およそつぎのようなヒト前立腺上皮細胞としての特性が明らかにされている。

1) 蛍光抗体染色法により、細胞質に免疫学的にヒト前立腺特異性のある豊富な酸フォスファターゼ活性を有している²⁶⁾。2) 抽出された EB 33 細胞の膜抗原はこの細胞に特異的なものであり、また前立腺癌患者のリンパ球は EB 33 に対し特異的に細胞毒性を示す²⁶⁾。3) EB 33 細胞はアンドロジェン依存および非依存細胞集団より成り立つと考えられ、アンドロジェン依存クローンが分離されている²⁷⁾、などである。したがって、EB 33 細胞は細胞学的には変性した面はあるにせよ、ヒト前立腺上皮細胞の特性をよく保持しており、本実験で検討した薬剤に対する感受性という点でも、例えば前立腺癌組織を直接に対象とした場合とくらべて不一致は少ないことが期待される。しかも EB 33 腫瘍はほぼ100%着床し、doubling time は約8日で増殖は比較的速やかであり、このような *in vivo* 実験系として好都合である。

さてヌードマウスを用いた抗腫瘍剤の効果検討は、さまざまなヒト癌組織が移植可能であり、継代によってもオリジナルの特性をよく維持することから、すでに1975年 Povlsen et al.²⁷⁾ によってその可能性が示唆され、1974年には継代移植中の Burkitt リンパ腫に対する cyclophosphamide の効果を腫瘍増殖曲線と組織学的所見とから検討し²⁸⁾、さらに翌年彼らは移植された悪性黒色腫に対して 5-FU, nitrosourea などの薬剤を用いて実験したが、得られた結果は臨床成績とよく一致したことを報告している²⁹⁾。このことは、ヌードマウスに移植された腫瘍は機能や形態とともに、薬剤感受性についても元の腫瘍と同じ性質を保持していることを示しており、従来みられなかった抗腫瘍剤の感受性テストの優れた *in vivo* システムとして注目を浴びようになり、現在までに内外を通じてすでに多数の成果が報告されている。

さて、このようなヌードマウスにおける感受性試験は、大別するとつぎの3つの指標を用いて行なわれているようである。

1. 組織学的所見
2. 腫瘍重量
3. 腫瘍増殖曲線

これらはそれぞれ長短があり、組織学的判定法は短期間での実験が可能であり、初代移植組織片においても検討するという利点のある半面、移植そのものに伴う組織像の変化と薬剤のおよぼす影響を如何に識別するか、またもたらさせる変化の不均一性という点、さらにこれを評価する上で客観性および定量性に欠け

る点は否めない。これに反して、腫瘍重量や増殖曲線による方法では何よりもヌードマウスで安定した成長を示す継代株を樹立する必要がある、由来組織にもよるがこのような成功率はおよそ20%台にすぎないこと^{30,31)}、実験終了までかなり長時間を要するため当座の症例そのものには有用とならない場合もあるなどの難点がある。しかしながら、薬剤の影響を客観的かつ定量的に表現しうること、前記の組織学的判定にくらべ副次的な因子で影響されることが少なく、効果をより正確に判定することは大きな利点があろう。いずれの方法によるにせよ、実験はつねにコントロールと対比するという形で行なうべきであって、さもないと結果を誤って判定する恐れがある。さらに念頭におくべきことは、移植部位と薬剤の特性についてである。ヌードマウスへの移植は背部皮下に行なわれるのが通例であるが、投与する薬剤の一定の組織親和性（例えばbleomycinと肺）が移植後もそのまま保たれるか否か、あるいは逆にマウス体内で皮膚あるいは皮下組織に比較的高濃度で集積することが予想されるneocarzinostatin, bleomycinなどでは、このような濃度勾配によって結果が修飾される恐れはないかなども留意する必要がある。

今回の実験では、われわれは前述のさまざまな理由から、ヒト前立腺癌由来の長期継代培養細胞EB33の定量的接種（10⁶個/マウス）により形成される腫瘍の増殖曲線を移植後日数の等しい対照群のそれと比較し、有意差検定を行なうことによって効果を検討し、かつ投与薬剤の副作用判定の目安として経時的に体重変動をチェックし、薬剤間の濃度バランスを勘案しつつ有効性を吟味した。この際、壊死、融解などによって腫瘍体積の変動をきたしうる点を考慮し、実験は対照群の腫瘍が指数函数的増殖期にある移植後5～40日の間に完了した。

また本実験は、現在広く化学療法に関する臨床試験の行なわれている前立腺癌に対して、どのような作用機序の化学療法剤が有効性を持つかという指針を得ることを第一義として、代謝拮抗剤、アルキル化剤および分裂阻害剤としてそれぞれ代表的な5-FUあるいはFT, CPM, VCRを選択し、これらの単剤としての効果およびそれぞれの薬剤間の相乗ないし相加効果の検討を主たる目的とした。ただし5-FUについては、単剤効果の検討以外はそのmasked compoundであるFTを用いて実験を行なった。5-FUにくらべ、副作用、ことに骨髄抑制が低いので、高齢者を対象とする臨床の場では好適と考えられるからである³²⁾。

本実験においては、5-FU 20 mg/kg 14日間連続投

与によっても対照群との間にはほとんど差異は認められなかった。一方FT 60 mg/kgの同様の実験では対照群にくらべ増殖は抑制される傾向にあり（ $p<0.10$ ）、しかも体重減少は5-FUよりも明らかに小さく、よって併用時の効果検討にはすべてFTを用いることにした。

代表的なアルキル化剤であるCPMを用いた実験では、10 mg/kg 14日間投与により対照群との間に有意の縮小がみられ（ $p<0.05$ ）、しかも体重減少が軽微であったことから、CPMはEB33腫瘍に対して優れた抗腫瘍効果をもつといえる。前述のごとく、臨床試験におけるScott et al.¹⁸⁾の報告にみられる5-FUよりもCPMの方が有意の延命効果をもたらすという事実、またCPM単独投与はADM, 5-FUおよびCPM併用よりも有効であるとする報告²²⁾によく符号する結果であった。

またVCRも0.45 mg/kg/day 3日ごと7回投与によって対照群とくらべ有意の縮小がみられた。しかし注射開始後13日目（4回投与後）には実験群6匹中3匹のマウスに腸管の膨隆、鼓腸が著明にみられ疲弊が強かったので屠殺した。よって次後の有意差検定は不能であったが、本剤の副作用のひとつである末梢神経障害による腸管麻痺³³⁾が生じたものと推定された。VCRは同じvinca alkaloidであるvinblastineにくらべ骨髄抑制などの副作用は軽度とされているが、有効量と中毒量の閾値の差が小さい³⁴⁾ので、ことに臨床的に高齢者への使用にあたっては細心の注意が必要であろう。また本剤は現在施行されている米国NPCPのプロトコル#800で、単独あるいはestramustineとの併用により効果が実際に試験されつつあるが、われわれの実験結果からするとかなり好結果が得られるものと信ずる。

さてこれらFT, CPM, VCR 3剤のうち2剤の組み合わせによる併用効果の検討では、CPM+VCR群に相加効果が認められ、FT+CPM群にもその傾向が示唆された。そしてこれら3剤の併用では増殖は抑制されるようであったが対照群との間に有意差をみなかった。

通常多剤併用による効果ことに相乗効果は、本実験のごとく作用機序を全く異にする薬剤の組み合わせよりもむしろ同系の薬剤、例えばDNA合成に関与する比較的近い過程で阻害作用を示すような薬剤の併用を行なった場合に強く発揮されることが多く、作用機序が非常に異なる場合、併用のため投与量を少なくすることによってかえって相加効果もえられない場合も生じるといわれている³⁴⁾。本実験において2剤ないし3

剤併用によって相乗効果はおおよそ認められず、単剤として有効性が証明された GPM, VCR の併用時のみ相加効果が認められた理由のひとつと思われる。

近年、ことにホルモン療法再燃例への効果も期待されている Estracyt については本実験では有効性は示されなかったが、これは本剤の構造上から、また Yamanaka et al.³⁵⁾ のラット前立腺におよぼす影響を調べた実験から、本剤の効果は主としてエストロゲン作用によるのであろうとの見解が正しいとするなら、EB 33 腫瘍はアンドロゲン依存性に乏しいので効果が低かったと思われる。しかし、ヒトにおける Estracyt の代謝、前立腺癌への作用機序はいまだすべて解明されてはおらず、Kadohama et al.³⁶⁾ の指摘するように動物とヒトでは本剤の代謝に差があり、動物を用いた *in vivo* 実験成績を以て直ちに臨床効果を説明できないのかもしれない。

最近、さまざまな領域で CDDP の優れた抗腫瘍効果に関する報告が相次いでいるが、われわれも上記の実験とは別の機会に、継代84代の EB 33 細胞を用いた同様の実験方法で CDDP の有効用量決定試験を行なったところ、5日間 IP 投与で増殖曲線上 1.5 mg/kg では変化なく、3 mg/kg で対照群にくらべ明らかに縮小するようであった。またごく最近、由井³⁷⁾ もヌードマウスに継代された未分化前立腺癌を用いた実験により本剤の抗腫瘍効果を認めたと報告している。CDDP の臨床での使用は、すでに1977年 Merrin²³⁾ が前立腺癌に対する最初の治療経験を通じて、現在までのところ本剤は最も有効な薬剤であろうと述べており、今後前立腺癌に対する化学療法において重要な役割を占めるものと思われる。

以上ヌードマウスに移植した EB 33 腫瘍の増殖曲線実験により、前立腺癌化学療法剤として GPM について VCR が有効と思われること、代謝拮抗剤の効果は顕著でなかったが、5-FU よりも FT の方が副作用の点でもより効果的と思われること、CDDP は優れた抗腫瘍効果を持ち今後有力な治療剤のひとつとなるであろうことを明らかにした。そして、得られた実験結果をもとに、現在までに報告された臨床知見を参考にし、われわれはすでに GPM, VCR, FT の3者併用により³⁸⁾、あるいは CDDP または GPM 単独で進行したホルモン療法再燃例に対して治療を行なっている。結果は別の機会に譲るとして、われわれ自身の反省を通じ、また幾つかの臨床報告に接して、ホルモン療法に固執し化学療法開始の時期が遅きに失する像向にあることを痛感する次第である。

このようなホルモン療法抵抗性の本態ないしはそれ

を獲得していく過程はすべて解明された訳ではないが乳癌において女性ホルモン依存性の喪失がみられると同様に腫瘍組織中のホルモン依存性細胞集団と非依存性集団の量的関係によって規定されることは間違いないであろう。現状では癌組織中のアンドロゲン受容体を定量的に解析することは技術的に困難であるためホルモン療法継続の適応が否かは専ら臨床所見によるのである。したがってホルモン療法再燃の徴候が臨床的に認められたなら、早期に他の治療法に移行すべきであろう。時期を失した化学療法は必然的に不充分となり、そしてそれは免疫能の低下など生体予備能を低下させかえって癌の進行を速める結果となるからである。

前立腺癌化学療法の現状はいまだ満足すべきものではないが、その機運はようやく高まりつつあり、本邦における広汎な臨床試験プロジェクトの組織化を望むとともに、本実験系を用いた他の薬剤および併用療法の検討がわれわれのつぎの課題と考える。

ま と め

1. ホルモン環境を一定にしたヌードマウスにヒト前立腺癌由来の EB 33 細胞の接種によって生じた腫瘍 (EB 33 腫瘍) を対象として、腫瘍増殖曲線によって作用機序を異にする非ホルモン化学療法剤の効果を検討した。

2. 対照群20匹の腫瘍増殖曲線は細胞接種後5~40日間にわたり半対数グラフ上で相関係数の高い直線相となり ($r=0.9871$)、この期間内で薬剤投与群 (平均6匹) のそれと比較し有意差検定を行うことによって有効性を正確に判定することができた。

3. 上記の方法によって、代謝拮抗剤として 5-fluorouracil (5-FU) あるいは Futraful (FT), アルキル化剤として cyclophosphamide (GPM), また分裂阻害剤として vincristine (VCR) を選び、これらの単剤としての効果およびこのうちの2剤、あるいは3剤併用した際の効果を検討した。

またこれらとは別に、近年前立腺癌に対する効果が期待されている Estracyt および cis diamminedichloride platinum (CDDP) についても EB 33 腫瘍に対する効果を検討した。

4. 各薬剤の投与量は、単剤として臨床常用量の3倍を一応の基準とし、予備実験における体重減少の程度に応じて増減して各薬剤の濃度のバランスをはかった。また対照群を含め腫瘍計測とともに体重を測定し実験開始前のそれと比較して副作用のパラメーターのひとつとした。各薬剤は滅菌蒸留水で希釈し、0.1 ml/

20 g マウス体重となるよう調整したものを腹腔内注射し、対照群には蒸留水のみ投与した。

5. 5-FU は 20 mg/kg 連日14日投与によっても腫瘍の増殖は有意に抑制されず、この濃度で中等度の体重減少がみられた。FT 60 mg/kg の同様の投与では対照群にくらべ縮小の傾向が認められ ($p < 0.10$)。しかも体重に殆んど変動を来さなかった。

6. CPM は 10 mg/kg 連日14日間、VCR は 0.45 mg/kg 3日毎7回注射したが、両者とも対照群にくらべ有意に腫瘍は縮小した ($p < 0.05$)。CPM では体重減少も軽微で優れた抗腫瘍効果が認められたが、VCR では体重減少は低かったが半数のマウス(6匹中3匹)にイレウス症状を来たし本剤の副作用によるものと考えられた。

7. Estracyt 20 mg/kg 14日間投与では腫瘍の縮小は対照群にくらべ有意差なく、しかも体重減少が中等度に認められ、本実験においては抗腫瘍効果は低いと判定された。

8. CDDP 1.5 mg/kg, 3.0 mg/kg 連続5日間投与により、後者で短期間ではあるが明らかな腫瘍の縮小がみられた。少数例のため有意差検定は不能であったが、EB 33 腫瘍に対する抗腫瘍効果は大きいものと考えられる。

9. FT, CPM, VCR の3剤のうち2剤を選んで併用による効果を検討したが、CPM+VCR の組み合わせで相加効果が認められたが、他の組み合わせおよび3剤併用による相乗効果あるいは相加効果は認められなかった。

10. 本実験で得られた結果は、現在臨床試験が行なわれている VCR を除いて、これまでに得られた臨床成績とはほぼ一致するものであり、前立腺上皮細胞の特性をよく保持している EB 33 腫瘍を用いたこの実験系は、今後の研究に有用であると考えられる。

11. 前立腺癌に対する非ホルモン性化学療法の歴史と現状を述べその問題点を指摘したが、臨床的に抗男性ホルモン療法に再燃したと診断された stage D 症例に対しては速やかに化学療法を選択すべきことを強調した。

この実験に使用した EB 33 細胞の永久株樹立と細胞学的な検討、ヌードマウスへの前立腺癌組織あるいは EB 33 細胞の移植に関する基礎的研究は、西ドイツヴュルツブルグ大学泌尿器科学教室および放射線医学研究所でなされたものであるが、指導と助言を受けた現ロッテルダム、エラスムス大学泌尿器科教授である長友 F.H. Schroeder 博士に心から謝意を表明する。また直接実験の補助にあたった平井多美子氏の尽力に

対しても深く感謝する。

なお本論文のデータの一部は、1976年第66回日本泌尿器科学会シンポジウム、1978年第16回日本癌治療学会ワークショップ、第28回日本泌尿器科学会中部連合総会シンポジウム等において発表されたことを附記する。また、本研究の一部昭和53年度厚生省がん助成金(53-20)によって行なわれたことを附記する

文 献

- 1) Byar, D. P.: The Veterans Administration Cooperative Urological Research Group's studies of cancer of the prostate. *Cancer*, **32**: 1126~1130, 1973.
- 2) Catalona, W. J. and Scott, W. W.: Carcinoma of the prostate, from Campbell's Urology. Vol. 2, pp. 1085~1122, W. B. Saunders Co. Philadelphia, USA, 1979.
- 3) Carter, S. K. and Wasserman, T. H.: The chemotherapy of urologic cancer. *Cancer*, **36**: 729~747, 1975.
- 4) Okada, K. and Schroeder, F. H.: Human prostatic carcinoma in cell culture. Preliminary report on the development and characterization of an epithelial cell line (EB 33) *Urol. Res.*, **2**: 111~121, 1974.
- 5) Okada, K. et al.: Human prostatic adenoma and carcinoma. Transplantation of cells and primary tissue fragments in "nude" mice. *Invest. Urol.*, **13**: 395~403, 1976.
- 6) Okada, K. et al.: Human prostatic epithelial cells in culture. Clonal selection and androgen dependence of cell line. EB 33 *J. Urol.*, **115**: 164~167, 1976.
- 7) Weyrauch, H. M. and Nesbet, J. D.: Use of triethylene thio-phosphamide (thio-TEPA) in treatment of advanced carcinoma of prostate. *J. Urol.*, **81**: 185~193, 1959.
- 8) Fox, M.: The effect of cyclophosphamide on some urinary tract tumors. *Br. J. Urol.*, **37**: 399~409, 1965.
- 9) Flocks, R. H.: Carcinoma of prostate. *J. Urol.*, **101**: 741~749, 1969.
- 10) Flocks, R. H. and Cheng, S. F.: Combination therapy for prostatic carcinoma. *J. Iowa Med. Soc.*, **58**: 125~129, 1968.
- 11) Tucker, W. G., et al.: Preliminary trials with combination therapy of cyclophosphamide (NSC-26271), vincristine (NSC-6754), and 5-flu-

- ouracil (NSC-19893) *Cancer Chemother. Rep.*, **52**: 593~596, 1968.
- 12) Kane, R. D. et al.: Multiple drug chemotherapy regimen for patients with hormonally-unresponsive carcinoma of the prostate: a preliminary report. *J. Urol.*, **117**: 467~471, 1977.
- 13) Yagoda, A.: Non-hormonal cytotoxic agents in the treatment of prostatic adenocarcinoma. *Cancer*, **32**: 1131~1140, 1973.
- 14) Nagel, R. and Kolln, C.-P.: Treatment of advanced carcinoma of the prostate with Estracyt. *Prostatic Disease*, pp. 267~283, Alan R. Liss, Inc., New York, USA, 1976より引用.
- 15) Carter, S. K. and Soper, W. T.: Integration of chemotherapy into combined modality treatment of solid tumors. 1. Overall strategy. *Cancer Treatment Rev.*, **1**: 1~13, 1974.
- 16) Schmidt, J. D.: Chemotherapy of prostatic cancer. *Urol. Clin. North Am.*, **2**: 185~196, 1975.
- 17) Scott, W. W. et al.: The continued evaluation of the effects of chemotherapy in patients with advanced carcinoma of the prostate. *J. Urol.*, **116**: 211~213, 1976.
- 18) Scott, W. W. et al.: Comparison of 5-Fluorouracil (NSC-19893) and Cyclophosphamide (NSC-26271) in patients with advanced carcinoma of the prostate. *Cancer Chemother. Rep.*, **59**: 195~201, 1975.
- 19) De Wys, W. D.: Comparison of Adriamycin (NSC-123127) and 5-Fluorouracil (NSC-19893) in advanced prostatic cancer. *Cancer Chemother. Rep.*, **59**: 215~217, 1975.
- 20) Eagan, E. T. et al.: Adriamycin versus 5-Fluorouracil and Cyclophosphamide in the treatment of metastatic prostatic cancer. *Cancer Treat. Rep.*, **60**: 115~117, 1976.
- 21) Murphy, G. P. et al.: Chemotherapy of advanced prostatic cancer by the National Prostatic Cancer Group. *Semin. Oncol.*, **3**: 103~106, 1976.
- 22) Chlebowski, R. T. et al.: Cyclophosphamide (NSC 26271) versus the combination of adriamycin (NSC 123127), 5-fluorouracil (NSC 19893), and cyclophosphamide in the treatment of metastatic prostatic cancer. A randomized trial. *Cancer*, **42**: 2546~2552, 1978.
- 23) Merrin, C.: Treatment of advanced carcinoma of the prostate (stage D) with infusion of cis-diamminedichloroplatinum II (NSC 119875). A pilot study. *J. Urol.*, **119**: 522~524, 1977.
- 24) Kondo, T.: Prediction of response of tumor and host to cancer chemotherapy. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, **34**: 251~256, 1972.
- 25) Pontes, J. E. et al.: Indirect immunofluorescence for identification of prostatic epithelial cells. *J. Urol.*, **117**: 459~463, 1977.
- 26) Ackermann, R. et al.: Antigenic properties of a cell line from human prostate carcinoma (EB 33). *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **49**: 47~49, 1978.
- 27) Povlsen, C. O., et al.: A Spiegel (ed.), *The Laboratory Animals in Drug Testing*. Fifth ICLA Symposium, pp. 63~72, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1973.
- 28) Povlsen, C. O. and Raygaard, J.: Effects of cyclophosphamide (Endoxan) on a Burkitt's lymphoma serially grown in nude mice. *Proc. 1st Internat. Workshop on nude mice*, pp. 285~292, Fisher Verlag, Stuttgart, 1974.
- 29) Povlsen, C. O. and Jacobson, G. K.: Chemotherapy of a human malignant melanoma transplanted in the nude mouse. *Cancer Res.*, **35**: 2790~2796, 1975.
- 30) 永井完治・ほか：人の腫瘍のヌードマウスへの移植—移植成績と移植腫瘍の性状について— *癌の臨床*, **22**: 745~754, 1976.
- 31) 田口鉄男・ほか：Nude Mouseを用いた制癌剤感受性試験について. *最新医学*, **33**: 2300~2305, 1978.
- 32) 岡田謙一郎・ほか：N₁-(2-Tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil (Futrafal) による泌尿器科領域悪性腫瘍の治療について. *癌と化学療法*, **5**: 605~613, 1978.
- 33) Carter, S. K. et al.: *Chemotherapy of cancer*, pp 60, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1977.
- 34) 太田和雄：癌の化学療法—多剤併用療法, p. 5, 日本新薬, 1973.
- 35) Yamanaka, H. et al.: Effect of estracyt on the prostate. *Invest. Urol.*, **14**: 400~404, 1977.
- 36) Kadohama, N. et al.: Estramustine phosphate: metabolic aspects related to its action in prostatic cancer *J. Urol.*, **119**: 235~239, 1978.

- 37) 由井康雄：ヒト泌尿生殖器系悪性腫瘍の異種移植に関する研究 第1報 ノードマウスへの移植実験およびノードマウス可移植性ヒト前立腺癌に対する治療実験. 日泌尿会誌, **70**: 28~45, 1979.
- 38) 岡田謙一郎：前立腺癌の化学療法と放射線治療, 泌尿紀要, **25**: 453~456, 1979.
(1979年7月10日迅速掲載受付)